

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :  
(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

**2 490 648**

A1

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21)

**N° 80 19031**

(54) Résines photoactivables, leur préparation et leur application à la fixation de molécules d'intérêt biologique.

(51) Classification internationale (Int. Cl. <sup>3</sup>). C 08 B 37/08; C 12 N 11/00; G 03 C 1/72.

(22) Date de dépôt..... 3 septembre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 12 du 26-3-1982.

(71) Déposant : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, Etablissement public,  
résidant en France.

(72) Invention de : Sames Sicsic, Joëlle Leonil, Claude Wakselman et François Le Goffic.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Harlé et Lechopiaz.

La présente invention concerne des résines photo-activables, notamment utiles pour la fixation de molécules d'intérêt biologique.

5 L'immobilisation de molécules d'intérêt biologique (petites molécules, enzymes, anticorps, organelles, etc.) intéresse vivement tant les chercheurs scientifiques que les industriels. Les avantages que confère l'immobilisation de telles molécules sont nombreux et on été largement décrits dans la littérature. En particulier, les petites molécules, 10 ainsi que des anticorps, fixés sur un support, servent surtout à des fins de purification (chromatographie d'affinité), alors que les enzymes ou organelles immobilisées sont avantageusement utilisées en chimie /<sup>industrielle</sup> (notamment pour le dédoublement d'amino-acides et pour la réalisation de synthèses diverses 15 en chimie organique).

De très nombreuses méthodes d'immobilisation combinant une grande variété de supports et de réactifs de fixation ont déjà été décrites (voir par exemple à ce sujet l'ouvrage de S.P. Colowick et N.O. Kaplan intitulé "Methods in 20 Enzymology", Vol. XLIV, 1976).

L'une de ces méthodes consiste à fixer un agent bifonctionnel de type aryl azide convenablement substitué sur un support solide, par voie thermochimique et à l'abri de la lumière, et à activer photochimiquement le produit obtenu et 25 le faire réagir avec une enzyme, formant ainsi une enzyme fixée par liaison covalente sur un support (voir brevet US 3.959.078). Le procédé faisant intervenir ces aryl azides, et en particulier le 4-fluoro-3-nitrophényl azide, doit cependant être conduit dans le noir pour la première étape. L'azide (tel que 30 le 4-fluoro-3-nitrophényl azide) de départ doit également être lui-même conservé à l'abri de la lumière. De plus, le produit formé, ante à réagir photochimiquement avec des en-

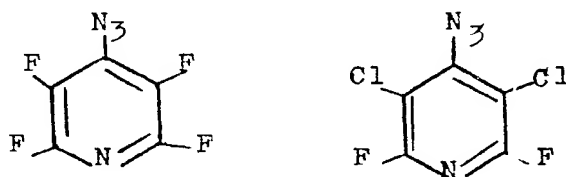
35 dont la présence favorise une dégradation avec le temps du produit final. L'activation photochimique se fait dans la lumière visible et nécessite une illumination pendant 1 à

l'indiquent les exemples du brevet US susdit

On a maintenant trouvé qu'on peut préparer une nouvelle résine photoactivable, stable à la lumière visible et qui, après une activation photochimique par des rayonnements de longueurs d'onde appropriées pendant des périodes de temps n'excédant pas une demi-heure environ, se fixe par liaison covalente à toutes les molécules d'intérêt biologique, telles que celles évoquées plus haut.

L'invention a pour premier objet une résine photoactivable, qui résulte de la réaction de dérivés fluorés de pyridinyl azide avec du chitosan.

Par dérivés fluorés de pyridinyl azide, on entend selon la présente invention essentiellement les deux composés suivants :

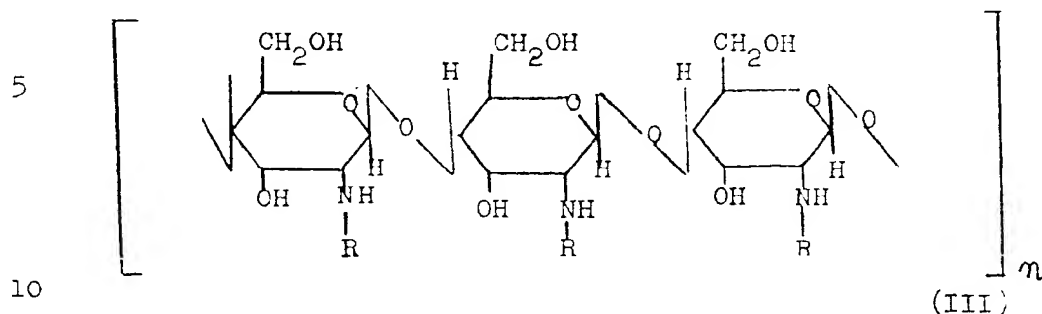


(I)

(II)

Ils peuvent être synthétisés respectivement à partir de pentafluoropyridine ou de dichloro-3,5 trifluoro-2,4,6 pyridine, qui sont des molécules connues et commercialisées, et d'azoture de sodium, par exemple comme décrit par R.E. Banks et G.R. Sparkes dans J. Chem. Soc. Perkin I, 1972, p. 2964.

Le chitosan est le support de fixation et est obtenu par hydrolyse chlorhydrique de la chitine, qui est un polysaccharide de structure des membranes des insectes et des arthropodes et peut être obtenue par biosynthèse à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine sous l'action d'un système enzymatique spécifique. La formule développée plane de ces



où  $R = -COCH_3$  pour la chitine et  $-H$  pour le chitosan, et  $n$  est tel que le poids moléculaire soit de 200.000 - 500.000.

15 Le procédé selon l'invention pour la réalisation de ces résines comprend fondamentalement la condensation à chaud du réactif fluoré susdit, qui peut être notamment l'un des deux composés de formule (I) ou (II) susdits ou un mélange de deux, avec du chitosan dans un solvant approprié.

20 Il ressort de la formule (III) que le chitosan contient beaucoup de fonctions amine ; ces fonctions réagissent avec le fluor en position 2 sur le cycle pyridine et, après élimination d'une molécule de HF par fonction concernée, il se forme une liaison covalente entre les deux réactifs. A cet égard, en jouant sur les conditions réactionnelles et les rap-  
 25 ports de concentration des réactifs en présence, l'homme de l'art peut à volonté, maîtriser le taux de fixation du réactif sur le polymère. L'intérêt que cela présente est très grand car, selon le taux de greffage retenu, la résine peut être soluble ou non en milieu acide. Un faible taux de greffage laisse, en effet, des fonctions amines libres, qui peu-  
 30 vent être salifiées. Elle est insoluble en milieu basique et dans les solvants organiques.

La résine obtenue est une poudre brune et possède de bonnes propriétés mécaniques, qui la rendent tout à fait appropriée pour

un usage en réacteur enzymatique et comme résine pour chromatographie.

L'invention a également pour objet l'application de ces résines à la fixation de molécules d'intérêt biologique par photoactivation sous l'effet d'un rayonnement ayant des longueurs d'onde comprises entre 300 et 360 nm environ, en présence de la (ou des) molécule(s) d'intérêt biologique à fixer de préférence pendant une durée d'au plus 30 minutes environ, et avantageusement, de 15 à 30 minutes environ.

Les résines selon l'invention contiennent en effet un groupement azoture ( $N_3$ ) et sont photoactivables dans cette plage de longueurs d'onde ; elles donnent alors des nitrés, qui sont des entités très réactives aptes à s'insérer en particulier dans les liaisons C-C et C-H des molécules en présence desquelles on les met et à former ainsi des liaisons avec elles.

Pratiquement, toutes les molécules d'intérêt biologique peuvent ainsi être fixées et stabilisées, et les systèmes biologiquement actifs obtenus sont aptes à être utilisés, avec des risques atténués de perte d'activité et/ou de lixiviation, dans toutes les applications auxquelles peuvent être affectées les molécules concernées, notamment en réacteur enzymatique et comme résine de chromatographie.

L'invention est décrite plus en détail en référence aux exemples illustratifs ci-après, qui ne la limitent aucunement.

#### Exemple 1.

##### a) - Préparation de la résine photoactivable.

Dans 30 cm<sup>3</sup> de DMF, on a dispersé 1 g de chitosan (soit 3,9 méq  $NH_2/g$ ) ; on y a ajouté soit du tétrafluoropyridinyl azide, soit du dichloro-3,5 difluoro-2,6 pyridinyl azide, en excès de 3, et 400 mg de triéthylamine ( $Et_3N$ ).

Après 24 heures de réaction, la poudre résultante, successivement avec 50 cm<sup>3</sup> de méthanol, 20 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque 1N, 50 cm<sup>3</sup> d'eau, 50 cm<sup>3</sup>

on a séché au dessiccateur.

En suivant ce mode opératoire et en faisant varier les conditions, on a réalisé plusieurs préparations, comme indiqué dans le tableau ci-dessous, où figurent les rendements de fixation obtenus dans chaque cas. Ces rendements sont calculés sur la base des groupements  $\text{NH}_2$  n'ayant pas réagi, la détermination des groupements aminés étant réalisée par dosage potentiométrique.

10	Réactif de type azide	T (C°)	t (h)	$\text{Et}_3\text{N}$	% de fixation
	I	80	112	-	31
	II	100	48	-	18
15	II	80	72	oui	75
	II	80	72	oui	64
	II	80	72	oui	68
	II	80	72	oui	57

20 b) - fixation de molécules biologiques sur la résine photo-activable.

On a mis en présence 1 mg de L-aminoacide acylase dissoute dans un tampon approprié et 50 mg de résine photo-activable préparée comme indiqué ci-dessus, dans un réci-  
 25 pient en verre pyrex et on a soumis le tout à une irradiation entre 300 et 360 nm, pendant 15 minutes, avec interposition d'un filtre en verre éliminant les radiations de longueur d'onde inférieure à 300 nm, destructrices des protéines et  
 30 en utilisant une lampe Philips SP 500 W à haute luminescence et faisceau dirigé permettant une émission à fond continu avec un maximum à 360 nm.

On a lavé la résine par un tampon approprié. On a pu fixer ainsi 0,6 mg d'enzyme.

On notera que le filtre en verre utilisé laisse

passer seulement environ 10-15 % de l'énergie à 310 nm et environ 45 % de celle-ci à 325 nm.

On préfère donc utiliser le composé de type azyde de formule (II), sachant qu'il présente deux bandes d'absorption, dont une forte à 230 nm et une faible à 325 nm, alors que le composé de formule (I) présente deux bandes d'absorption situées à 230 nm (forte) et à 315 nm (faible).

L'activité résiduelle de l'enzyme fixée était de 25 % par rapport à celle de l'enzyme libre. Le système enzymatique obtenu ne présentait aucune perte d'activité après une conservation de plusieurs semaines sans précautions particulières. Après deux semaines d'utilisation en non-continu de ce système porteur d'enzyme, on n'a décelé aucune perte notable d'activité enzymatique.

#### 15 Exemple 2

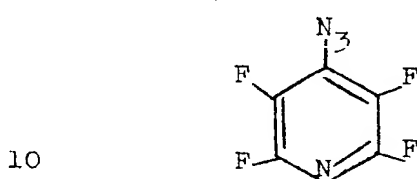
On a suivi le mode opératoire de l'exemple 1, mais en remplaçant la L-amino-acide acylase par de la bêta-galactosidase. On a ainsi pu fixer environ 60 % de la qualité d'enzyme introduite et obtenu une activité résiduelle de l'enzyme fixée d'environ 25 % par rapport à celle de l'enzyme libre correspondante. Aucune perte d'activité n'a été notée après 10 jours d'utilisation en continu dans un réacteur à lit fluidisé.

On a également immobilisé selon un mode opératoire similaire des antibiotiques, à savoir respectivement de l'acétyltobramycine avec un atome de carbone radioactif et de la netilmicine. On a chaque fois obtenu des systèmes actifs dans lesquels la molécule active n'était pas dénaturée.

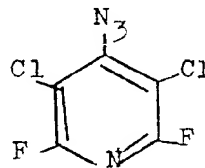
REVENDICATIONS

1. Résine photoactivable, caractérisée en ce qu'elle est formée par réaction de dérivés fluorés de pyridinyl azide avec du chitosan.

5 2. Résine selon la revendication 1, caractérisée en ce que les dérivés fluorés de pyridinyl azide sont l'un des composés de formule ci-après :



(I)



(II)

ou leurs mélanges.

15 3. Procédé pour la préparation d'une résine selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend fondamentalement la condensation à chaud, notamment entre 80 et 100°C environ, du réactif fluoré susdit avec du chitosan, en milieu solvant.

20 4. Application de la résine selon l'une des revendications 1 ou 2 à la fixation de molécules d'intérêt biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend la photoactivation de ladite résine sous l'effet d'un rayonnement ayant des longueurs d'onde comprises entre 300 et 360 nm environ, en présence d'au moins une molécule d'intérêt biologique à fixer.

25 5. Application selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'on effectue l'irradiation pendant au plus 30 minutes, environ de préférence pendant 15 à 30 minutes environ.

30 6. Application selon l'une des revendications 4 à 5, caractérisée en ce que les molécules d'intérêt biologique sont choisies parmi les petites molécules, les enzymes, les anticorps et les organelles.